

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 112**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/558** (2006.01)

**G01N 33/72** (2006.01)

**G01N 33/533** (2006.01)

**G01N 33/538** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2010 E 10778412 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2015 EP 2433140**

54 Título: **Sistemas y métodos para determinar el porcentaje de glucohemoglobina**

30 Prioridad:

**20.05.2009 US 180075 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**20.05.2015**

73 Titular/es:

**RELIA DIAGNOSTIC SYSTEMS, INC. (100.0%)  
1700 Owens Street Suite 515  
San Francisco, CA 94158, US**

72 Inventor/es:

**RUTTER, WILLIAM, J.;  
HAN, JANG, H. y  
KWON, TAEWOO**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 536 112 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Sistemas y métodos para determinar el porcentaje de glucohemoglobina

- 5 La diabetes sacarina es un trastorno crónico caracterizado por deficiencia de insulina, hiperglucemia y alto riesgo de desarrollo de complicaciones en ojos, riñones, nervios periféricos, corazón y vasos sanguíneos. La enfermedad es altamente prevalente, afectando a del orden de 16 millones de personas en los EE.UU. La enfermedad es también costosa, en términos tanto de sufrimiento humano como de dólares; se estima que aproximadamente 1 de cada 7 dólares gastados en cuidados sanitarios en los EE.UU. van al cuidado de la diabetes, en su mayoría para el tratamiento de las complicaciones crónicas. En los EE.UU., la diabetes es la causa más común de ceguera en los jóvenes adultos, de insuficiencia renal y amputación de miembro no traumática.
- 10 El Ensayo de control y complicaciones de la diabetes (DCCT en inglés) completado en 1993 mostró que el riesgo de desarrollo y progresión de las complicaciones crónicas de la diabetes está estrechamente relacionado con el grado de control glucémico, como se mide mediante determinaciones de glucohemoglobina (GHb). El DCCT proporcionó también un gran conjunto de datos que relacionan los valores de GHb con la glucosa sanguínea media. Por tanto, los resultados del DCCT han fijado el escenario para establecer objetivos de tratamiento de diabetes específicos usando GHb como índice de la concentración media de glucosa sanguínea.
- 15 Idealmente, la detección temprana de niveles de glucosa sanguínea alterados conduciría a una monitorización cuidadosa y a un control a largo plazo de las concentraciones de glucosa sanguínea. Existe la necesidad de un ensayo rápido y exacto para medir los niveles de glucosa sanguínea. Muchos ensayos de monitorización de glucosa sanguínea actuales están sometidos a una toma de alimento reciente u otras costumbres del estilo de vida que pueden causar que fluctúen drásticamente los niveles de glucosa a corto plazo. Estos pueden no dar una visión exacta de las tendencias de los niveles de glucosa sanguínea y pueden enmascarar niveles elevados en la situación inicial. Como se ha mencionado, se ha establecido anteriormente que los niveles elevados de glucosa sanguínea conducen a una glucación aumentada de la hemoglobina (Hb) en eritrocitos en circulación, y que el nivel de glucoHb está correlacionado con los niveles de glucosa durante aproximadamente un periodo de tres meses. Por lo tanto, la toma reciente de alimento tiene poco impacto sobre el nivel de glucoHb, dando por tanto un nivel más exacto de los niveles medios de glucosa sanguínea.
- 20 Se han desarrollado una variedad de ensayos de diagnóstico y dispositivos relacionados para el ensayo de diagnóstico inmediato (POC en inglés). A la vista de la conveniencia de los ensayos de diagnóstico de tipo POC y dispositivos relacionados, la prontitud de sus resultados y la alta incidencia de la diabetes, la necesidad de un ensayo de diagnóstico temprano para el descubrimiento de la tendencia a diabetes y también de una terapia de monitorización ha destacado la extraordinaria necesidad de un ensayo de diagnóstico de tipo POC. Este está más adaptado para entornos no hospitalarios y también en situaciones en que no se requieran flebotomistas (concretamente, que no haya necesidad de extracciones de sangre). Generalmente, los dispositivos de POC pueden ser portátiles o transportables de otro modo. En algunos casos, pueden ser incluso de mano.
- 25 Además, debido que hay mucha variabilidad en los ensayos actualmente disponibles, sería deseable proporcionar sistemas de POC que tuvieran una alta sensibilidad, precisión, exactitud y fiabilidad de medida y que sin embargo estuvieran disponibles para grandes poblaciones. La presente invención describe un método de determinación de los niveles de glucosa sanguínea mediante la medida de la cantidad de glucohemoglobina en una muestra pequeña de sangre haciendo uso de tiras reactivas cromatográficas en un sistema de ensayo que es susceptible de configuración en dispositivo de tipo POC.
- 30 El documento US 6.399.293 B1 describe un elemento de ensayo y un método para determinar la relación de glucohemoglobina a hemoglobina no glucada en una muestra.
- 35 La presente invención está basada, en parte, en el descubrimiento de metodologías para el análisis cuantitativo de hemoglobina (Hb), glucohemoglobina (GHb) y otras variantes para ensayar. En consecuencia, la presente invención proporciona sistemas para efectuar los ensayos y métodos para determinar la cantidad de glucohemoglobina en una muestra de sangre. En algunas realizaciones, el sistema y los métodos descritos aquí pueden usarse en ensayos de diagnóstico inmediato (POC), con dispositivos puede pueden ser portátiles e incluso de mano, y en algunos casos pueden estar accionados a pilas. En ciertas realizaciones, las metodologías descritas aquí pueden estar exentas de CLIA (en que "CLIA" hace referencia a las Enmiendas para la mejora del laboratorio clínico en inglés).
- 40 En un aspecto de la invención, se proporciona una glucohemoglobina acoplada tanto con un anticuerpo que reconoce hemoglobina marcado con un primer marcador detectable como con un ácido borónico, o derivado del mismo, marcado con un segundo marcador detectable.
- 45 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para determinar el porcentaje de glucohemoglobina en una muestra, comprendiendo el método detectar un primer marcador detectable acoplado con un primer agente que se une a la hemoglobina en la muestra y un segundo marcador detectable acoplado con un segundo agente que se une solo a la glucohemoglobina en la muestra y determinar el porcentaje de glucohemoglobina en la muestra basándose en la cantidad del primer marcador detectable y del segundo marcador detectable detectada en la
- 50
- 55

muestra. Las señales del primer marcador detectable y del segundo marcador detectable pueden medirse simultáneamente, de forma opcional.

5 En otra realización, el método comprende detectar un primer marcador detectable acoplado con un primer agente que se une a la hemoglobina en la muestra y un segundo marcador detectable acoplado con un segundo agente, un ácido borónico o derivado del mismo, que se une solo a la glucohemoglobina en la muestra, y determinar el porcentaje de glucohemoglobina en la muestra basándose en la cantidad del primer marcador detectable y el segundo marcador detectable detectada en la muestra. Las señales del primer marcador detectable y el segundo marcador detectable pueden medirse simultáneamente, de forma opcional.

10 En aún otra realización, el método comprende las etapas de poner en contacto la hemoglobina liberada de las células de una muestra con un primer agente marcado con un primer marcador detectable que se une a hemoglobina, y con un segundo agente que está marcado con un segundo marcador detectable que se une solo a glucohemoglobina; inmovilizar la hemoglobina marcada detectablemente sobre un soporte sólido; medir las señales del primer marcador detectable y del segundo marcador detectable inmovilizado sobre el soporte sólido y determinar el porcentaje de glucohemoglobina en la muestra basándose en las señales del primer marcador detectable y del segundo marcador detectable. Las señales del primer marcador detectable y el segundo marcador detectable pueden medirse simultáneamente, de forma opcional.

20 En aun otra realización, el método comprende las etapas de poner en contacto la hemoglobina liberada de células de una muestra con un primer agente marcado con un primer marcador detectable que se une a hemoglobina, y con un segundo agente, un ácido borónico o derivado del mismo, que está marcado con un segundo marcador detectable que se une solo a glucohemoglobina; inmovilizar la hemoglobina marcada detectablemente sobre un soporte sólido; medir las señales del primer marcador detectable y del segundo marcador detectable inmovilizado sobre el soporte sólido y determinar el porcentaje de glucohemoglobina en la muestra basándose en las señales del primer marcador detectable y del segundo marcador detectable. En una realización ejemplar, se miden simultáneamente las señales del primer marcador detectable y del segundo marcador detectable.

25 En otra realización, el método comprende las etapas de poner en contacto la hemoglobina liberada de células de una muestra con un primer agente marcado con un primer marcador detectable que se une a hemoglobina, y con un segundo agente que está marcado con un segundo marcador detectable que se une solo a glucohemoglobina; inmovilizar la hemoglobina marcada detectablemente, incluyendo la glucohemoglobina marcada detectablemente, en la misma región sobre un soporte sólido; medir simultáneamente las señales del primer marcador detectable y del segundo marcador detectable inmovilizado sobre el soporte sólido y determinar el porcentaje de glucohemoglobina en la muestra basándose en las señales del primer marcador detectable y el segundo marcador detectable. El primer marcador detectable es un primer fluoróforo que muestra fluorescencia tras exposición a luz de una primera longitud de onda y el segundo marcador detectable es un segundo fluoróforo que muestra fluorescencia tras exposición a luz de una segunda longitud de onda, y las señales del primer marcador detectable y del segundo marcador detectable inmovilizado sobre el soporte sólido se miden exponiendo la región del soporte sólido en la que se ha inmovilizado hemoglobina, incluyendo glucohemoglobina, a luz de la primera y segunda longitudes de onda.

40 En otro aspecto de la invención, la invención proporciona una tira reactiva para determinar cuantitativamente el porcentaje de glucohemoglobina en una muestra de sangre que comprende una tira cromatográfica; un recubrimiento sobre una porción de la tira cromatográfica que comprende un agente de captura que se une a la hemoglobina en la muestra; una región en la tira cromatográfica a la que se añade la muestra y una región en la tira cromatográfica que comprende un primer agente marcado con un primer marcador detectable que se une a hemoglobina y un segundo agente marcado con un segundo marcador detectable que se une solo a glucohemoglobina, en la que la región en la tira cromatográfica que comprende el primer agente y el segundo agente se localiza (i) en la región en la que se añade la muestra o (ii) entre la región en la que se añade la muestra y la región que comprende el agente de captura, de tal modo que la muestra que se añade a la tira reactiva fluya a través de la región que comprende el primer y segundo agentes antes de alcanzar la región que comprende el agente de captura. Opcionalmente, el primer marcador detectable es un fluoróforo que muestra fluorescencia tras exposición a luz de una primera longitud de onda y el segundo marcador detectable es un fluoróforo que muestra fluorescencia tras exposición a luz de una segunda longitud de onda. En una realización ejemplar, se detectan simultáneamente el primer y segundo marcadores detectables.

50 En otra realización, la tira reactiva comprende una tira cromatográfica; un recubrimiento sobre una porción de la tira cromatográfica que comprende un agente de captura que se une a la hemoglobina en una muestra; una región en la tira cromatográfica en la que se añade la muestra y una región en la tira cromatográfica que comprende un primer agente marcado con un primer marcador detectable que se une a hemoglobina y un segundo agente que comprende un ácido borónico, o derivado del mismo, marcado con un segundo marcador detectable que se une solo a glucohemoglobina, en la que la región en la tira cromatográfica que comprende el primer agente y el segundo agente está localizada (i) en la región en la que se añade la muestra o (ii) entre la región en la que se añade la muestra y la región que comprende el agente de captura, de tal modo que la muestra que se añade a la tira reactiva fluya a través de la región que comprende el primer y segundo agentes antes de alcanzar la región que comprende el agente de captura.

La **Figura 1** muestra un diagrama de flujo ejemplar para la determinación del % HbA1c en una muestra de sangre. La muestra de sangre se lisa para liberar la Hb de los eritrocitos. Se pone en contacto la Hb liberada con un anticuerpo marcado detectablemente con un primer fluoróforo que se une a Hb (fl1-Ab1) y un derivado de ácido borónico, BD, marcado detectablemente con un segundo fluoróforo que se une solo a glucoHb (fl2-BD). Se exponen la Hb marcada y glucoHb a longitudes de onda de luz predeterminadas dirigidas al primer y segundo fluoróforos, respectivamente, para inducir fluorescencia. Se determina el porcentaje de glucoHb basándose en la fluorescencia del primer y segundo fluoróforos.

La **Figura 2** muestra un esquema para la determinación de glucoHb en una muestra de sangre según una realización de la invención. La muestra de sangre se expone a una disolución de lisis para liberar la Hb de los eritrocitos. Se añade la muestra lisada a una tira cromatográfica que comprende un anticuerpo marcado detectablemente con un primer fluoróforo que se une a Hb (fl1-Ab1) y un derivado de ácido borónico, ácido 3-aminofenilborónico (PB), marcado detectablemente con un segundo fluoróforo que se une solo a glucoHb (fl2-PB). La hemoglobina de la muestra se une al anticuerpo marcado con el primer fluoróforo y la glucohemoglobina de la muestra se une al derivado de ácido borónico marcado detectablemente con el segundo fluoróforo. La hemoglobina marcada fluye a lo largo de la tira cromatográfica a una zona de captura, área de detección o “banda de ensayo” que comprende un anticuerpo anti-Hb que se une a (y por tanto captura o inmoviliza) la hemoglobina. Se expone la tira cromatográfica a luz de longitudes de onda de 635 nm y 800 nm para inducir la fluorescencia del primer y segundo fluoróforos. Se determina el porcentaje de glucoHb basándose en la fluorescencia del primer y segundo fluoróforos.

La **Figura 3** muestra un esquema alternativo para la determinación de glucoHb en una muestra de sangre según otra realización de la invención. Se expone la muestra de sangre a una disolución de lisis para liberar la Hb de los eritrocitos. La disolución de lisis comprende un anticuerpo marcado detectablemente con un primer fluoróforo que se une a Hb (fl1-Ab1) y un derivado de ácido borónico, ácido 3-aminofenilborónico (PB), marcado detectablemente con un segundo fluoróforo que se une solo a glucoHb (fl2-PB). La hemoglobina de la muestra se une al anticuerpo marcado con el primer fluoróforo y la glucohemoglobina de la muestra se une al derivado de ácido borónico marcado detectablemente con el segundo fluoróforo. Se añade la hemoglobina marcada a una tira cromatográfica y fluye a lo largo de la tira cromatográfica hasta una zona de captura, área de detección o “banda de ensayo” que comprende un anticuerpo anti-Hb que se une a (y por tanto captura o inmoviliza) la hemoglobina. Se miden las señales del primer marcador detectable y del segundo marcador detectable inmovilizado sobre la tira cromatográfica. Se determina el porcentaje de glucoHb basándose en señales del primer y segundo fluoróforos.

La **Figura 4** muestra derivados de ácido borónico ejemplares que pueden acoplarse con un marcador detectable para preparar un agente marcado detectablemente que se une a glucoHb.

La **Figura 5a** muestra la conjugación de un ácido borónico que contiene un residuo amino en posición 3' con un fluoróforo, DY-782.

La **Figura 5b** muestra la conjugación de un ácido borónico que contiene un residuo de sulfhidrilo en posición 3' con un fluoróforo, DY-636.

La **Figura 6** muestra la conversión directa o reemplazo del ácido carboxílico de un fluoróforo por un grupo de ácido borónico sin el uso de un grupo amina o sulfhidrilo.

La **Figura 7** muestra un esquema de una tira reactiva ejemplar de la invención. La tira reactiva representada es una tira reactiva de flujo lateral bidireccional en la que el fluido añadido en el puerto I localizado en o cerca del extremo 1 fluye hacia el extremo 2 y el fluido añadido en el puerto II localizado en o cerca del extremo 2 fluye hacia el extremo 1. En la tira reactiva mostrada, se añade muestra en el puerto I y fluye hacia las regiones de reacción o zonas de captura, o zonas de detección que comprenden una “banda de ensayo” y dos “bandas de control”. La banda de ensayo comprende un agente de captura que se une a (y por tanto captura o inmoviliza) el analito en la muestra, por ejemplo la banda de ensayo puede comprender anticuerpo anti-Hb que se une a hemoglobina. Las bandas de control, “control alto” y “control bajo” comprenden un agente de captura que se une a, y por tanto captura, un control presente en la muestra. En realizaciones alternativas, las tiras reactivas de la invención pueden comprender ninguna, una o más de dos bandas de control. Puede añadirse opcionalmente en el puerto II fluido tal como muestra o tampón adicional, p.ej., tampón de lavado, como se muestra.

Se describen en la presente memoria sistemas y métodos para ensayar una muestra de sangre para determinar cuantitativamente el porcentaje de glucohemoglobina en la muestra de sangre. Generalmente, los métodos y sistemas descritos aquí pueden usarse en un dispositivo de diagnóstico inmediato (POC) así como en otros dispositivos de diagnóstico *in vitro* (IVD en inglés), según sea apropiado. En algunas realizaciones, los sistemas de tipo POC se diseñan para ensayo *in situ* por personal no técnico y pueden estar exentos de CLIA. En ciertos casos, los métodos y sistemas aquí descritos pueden usarse en dispositivos que son relativamente económicos de fabricar, y por tanto pueden ponerse ampliamente a disposición. Además, pueden usarse en dispositivos tales como dispositivos de tipo POC, que pueden proporcionar el análisis cuantitativo de las muestras de sangre en un periodo relativamente corto de tiempo (p.ej., 60 minutos o menos, 50 minutos o menos, 40 minutos o menos, 30 minutos o menos, 20 minutos o menos, 15 minutos o menos, 10 minutos o menos o de cinco a diez minutos, desde el momento de toma de muestra). Los sistemas y métodos de ensayo descritos en la presente memoria pueden usarse

con dispositivos tales como los descritos en la solicitud de patente de EE.UU. n° de serie 12/760.518, presentada el 14 de abril de 2010 y titulada "Diagnostic Devices and Related Methods.

5 La hemoglobina es el pigmento portador de oxígeno que da a la sangre su color rojo y también la proteína predominante en los eritrocitos. Aproximadamente un 90 % de la hemoglobina es hemoglobina A (la "A" representa el tipo adulto). Aunque un componente químico da cuenta del 92 % de la hemoglobina A, aproximadamente un 8 % de la hemoglobina A está compuesto por componentes minoritarios que son ligeramente diferentes químicamente. Estos componentes minoritarios incluyen hemoglobina A1c, A1b, A1a1 y A1a2. La hemoglobina A1c (HbA1c) es un componente minoritario de la hemoglobina al que está unido glucosa. Se hace referencia también a Hba1c como hemoglobina glicosilada, hemoglobina glucosilada o glucohemoglobina (GHb). Estos términos para GHb se usan intercambiablemente en la presente memoria.

10 Como se usa en la presente memoria, "hemoglobina" (Hb) hace referencia a todos los componentes de la hemoglobina o hemoglobina "total", incluyendo glucohemoglobina. En consecuencia, un agente que se une a, captura o inmoviliza hemoglobina también se une a, captura o inmoviliza glucohemoglobina.

15 En un aspecto de la invención, la invención proporciona un método para determinar el porcentaje de glucohemoglobina en una muestra. El método comprende detectar un primer marcador detectable acoplado con un primer agente que se une a la hemoglobina en la muestra y detectar un segundo marcador detectable acoplado con un segundo agente que se une solo a la glucohemoglobina en la muestra. El porcentaje de glucohemoglobina en la muestra puede determinarse basándose en la cantidad del primer marcador detectable y el segundo marcador detectable detectada en la muestra.

20 La muestra puede ser cualquier fluido que comprenda hemoglobina. En una realización, la muestra es una muestra de sangre, concretamente una gota u otra cantidad requerida de sangre. En otra realización, la muestra comprende células, p.ej. eritrocitos ("RBC") que contienen hemoglobina aislada de la sangre. Las células puede lisarse o permeabilizarse, pero no necesariamente, para liberar la hemoglobina.

25 En una realización, la muestra es una muestra de sangre o una muestra que comprende células que contienen hemoglobina aisladas de la sangre y la sangre o células sanguíneas se lisan o permeabilizan para liberar la hemoglobina de las células. Puede ponerse en contacto la muestra con un agente o agentes de lisis que permeabilizan las células durante suficiente tiempo para liberar la hemoglobina. Puede usarse también cualquier otro medio o medios de lisis para permeabilizar conocidos por un especialista en la materia. En una realización, puede usarse un tampón de lisis. Por ejemplo, la muestra de sangre puede lisarse en un tampón fosfato 4 mM, pH 7,5, 1 % de Triton X-100, NaCl 150 mM durante 1-2 minutos, u otros tampones de lisis conocidos por el especialista en la materia. En otra realización, pueden usarse medios mecánicos, por ejemplo ultrasonidos de alta energía (o "sonicación").

30 Puede ponerse en contacto entonces la muestra lisada que comprende hemoglobina liberada de los RBC con el primer agente marcado con un primer marcador detectable que se une a hemoglobina, y con un segundo agente marcado con un segundo marcador detectable que se une solo a la fracción de glucohemoglobina ("GHb") de la hemoglobina. El primer agente se une a hemoglobina formando un primer complejo detectable. El segundo agente se une a GHb. Por tanto, como se muestra por ejemplo en las Figuras 2 y 3, la glucohemoglobina tiene dos (2) marcajes, uno del agente que se une a hemoglobina y otro del agente que es específico de glucohemoglobina. Pueden detectarse el primer marcador detectable y el segundo marcador detectable y puede determinarse el porcentaje de glucohemoglobina en la muestra basándose en la cantidad del primer marcador detectable y del segundo marcador detectable detectada en la muestra.

35 En una realización, se separa cualquier primer agente que no esté unido a hemoglobina y cualquier segundo agente no unido a glucohemoglobina del primer agente y del segundo agente que están unidos a hemoglobina y glucohemoglobina, respectivamente, antes de detectar el primer y segundo marcadores detectables. Dicha separación puede efectuarse mediante cualquier medio conocido ahora o descubierto más tarde incluyendo, pero sin limitación, disponer la muestra en un campo eléctrico, mediante electroforesis, p.ej. electroforesis en gel o capilar, o inmovilizando la hemoglobina.

40 En una realización de la invención, se pone en contacto la hemoglobina liberada de las células de una muestra sanguínea con un primer agente marcado con un primer marcador detectable que se une a hemoglobina, y con un segundo agente, ácido borónico o un derivado del mismo, que está marcado con un segundo marcador detectable que se une solo a glucohemoglobina. La hemoglobina marcada detectablemente, incluyendo la glucohemoglobina marcada detectablemente, se localiza entonces en el área de detección en la que se miden las señales del primer y segundo marcadores detectables. En una realización, se localiza la hemoglobina, incluyendo la glucohemoglobina, en la misma área de detección en la que se miden las señales del primer y segundo marcadores detectables. En otra realización, se localiza la glucohemoglobina en un área de detección, p.ej. una primera área de detección, en que se miden las señales del primero y segundo marcadores detectables y se localiza la hemoglobina no glicada en un área de detección diferente, p.ej. una segunda área de detección, en que se detecta la señal solo del primer marcador detectable.

Puede usarse cualquier medio de localización conocido por un especialista en la materia. Por ejemplo, la hemoglobina marcada detectablemente puede inmovilizarse sobre un soporte sólido. Puede usarse cualquier soporte sólido en el que pueda inmovilizarse una proteína para inmovilizar la hemoglobina marcada detectablemente. Los soportes sólidos ejemplares incluyen, pero sin limitación, una tira cromatográfica, p.ej. una tira reactiva de flujo lateral, una varilla medidora, un dispositivo microfluídico, perlas, placas o columnas de vidrio o plástico, perlas magnéticas con o sin un recubrimiento de vidrio o plástico, etc. Pueden usarse también otros soportes sólidos conocidos por el especialista en la materia para inmovilizar la hemoglobina marcada detectablemente. En una realización, el soporte sólido es una tira cromatográfica, p.ej. una tira reactiva de flujo lateral o una varilla medidora. En otra realización, el soporte sólido es un dispositivo microfluídico, una placa de plástico de múltiples pocillos usada en ensayos ELISA o un sistema microcapilar.

El soporte sólido puede comprender, pero no necesariamente, un agente de captura inmovilizado que se une a, e inmoviliza así, la hemoglobina. En una realización, el agente de captura se inmoviliza sobre el soporte antes de poner en contacto la muestra o hemoglobina marcada detectablemente con el soporte sólido. En otra realización, el agente de captura puede añadirse a la muestra (o estar presente en un fluido, p.ej. tampón de lisis al que se añade muestra) antes de añadir la muestra al soporte sólido. El agente de captura se une a la hemoglobina en la muestra u otro fluido al que se añade la muestra. Cuando se añade la muestra al soporte sólido, p.ej. una columna que comprende perlas tales como perlas de resina o biotina/estreptavidina, el agente de captura se une al soporte e inmoviliza por tanto la hemoglobina unida. El término “agente de captura”, como se usa en la presente memoria, hace referencia a un resto (o composición) que puede inmovilizarse sobre un soporte sólido y que reconoce y se une a la hemoglobina en la muestra, de tal modo que cuando se une a hemoglobina, la hemoglobina “se captura” sobre el soporte sólido.

Las señales del primer marcador detectable unido a hemoglobina y del segundo marcador detectable unido a glucohemoglobina pueden medirse mediante cualquier medio conocido por el especialista en la materia. Las señales del primer y segundo marcadores detectables pueden medirse simultáneamente, pero no necesariamente. Se aprecia que cuando se inmoviliza Hb, incluyendo GHb, sobre un soporte sólido, se miden solo las señales de los agentes marcados detectablemente unidos o inmovilizados sobre un soporte sólido, y no aquellos libres en disolución. En algunas realizaciones, puede ser necesaria una etapa de lavado para eliminar cualquier agente marcado detectablemente no unido. Resultarán evidentes para un especialista en la materia los medios para asegurar que solo se miden las señales de los agentes marcados detectablemente unidos a hemoglobina y glucohemoglobina en aquellas realizaciones que usan otras técnicas de separación dadas a conocer anteriormente.

El porcentaje de glucohemoglobina en la muestra de sangre puede determinarse basándose en las señales del primer marcador detectable y del segundo marcador detectable. Además, puede determinarse el índice diabético según el programa nacional de estandarización de glucohemoglobina (NGSP en inglés).

Aunque los métodos de la invención pueden usarse con cualquier sistema, como se describe anteriormente, que pueda configurarse para determinar cuantitativamente el porcentaje de glucohemoglobina en una muestra, los métodos discutidos en la presente memoria hacen referencia a un sistema ejemplar, una tira reactiva que comprende una tira cromatográfica.

En una realización, se pone en contacto hemoglobina liberada de células de una muestra, p.ej. una muestra de sangre, con el primer agente marcado con el primer marcador detectable que se une a hemoglobina, y con el segundo agente marcado con el segundo marcador detectable que se une solo a glucohemoglobina, antes de añadir la muestra a la tira cromatográfica. En un ejemplo, las células de la muestra pueden lisarse poniendo en contacto la muestra con una disolución de lisis. El primer y segundo agentes marcados detectablemente pueden estar presentes, por ejemplo, en la disolución de lisis, de tal modo que la Hb, una vez liberada de los RBC lisados, esté en contacto con el primer y segundo agentes marcados detectablemente.

Como alternativa, la muestra se somete en primer lugar a lisis y posteriormente se pone en contacto la muestra lisada con el primer y segundo agentes marcados detectablemente. Después unirse el primer y segundo agentes marcados detectablemente a hemoglobina y glucohemoglobina, respectivamente, se añade la muestra a la tira cromatográfica, donde se inmoviliza la hemoglobina (incluyendo la glucohemoglobina) por el agente de captura y se detecta cuantitativamente.

En otra realización, como se muestra en la Figura 2, se añade la muestra lisada a la tira cromatográfica sin contacto previo con el primer y segundo agentes marcados detectablemente. En esta realización, el primer y segundo agentes marcados detectablemente se proporcionan sobre la tira cromatográfica en o cerca del punto en que se añade la muestra lisada a la tira cromatográfica, de tal modo que la Hb y GHb en la muestra lisada interaccionen con el primer y segundo agentes marcados detectablemente sobre la tira cromatográfica antes de fluir a través de la tira cromatográfica hasta la porción que comprende el agente de captura.

Los agentes de captura ejemplares incluyen, pero sin limitación, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un antígeno, un péptido, un hapteno o una proteína genomanipulada. En una realización, el agente de captura es un anticuerpo que reconoce y se une a Hb. El agente de captura puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal, p.ej., un anticuerpo policlonal que reconoce epítomos comunes presentes en todas las moléculas de

hemoglobina tales como A, A2, F, C, D, E y S. Como alternativa, el agente de captura puede comprender una mezcla de anticuerpos específicos para cada variante. Los ejemplos adicionales de agentes de captura incluyen fragmentos de anticuerpo tales como Fab, F(ab)<sub>2</sub>, nanocuerpos, diacuerpos, aptámeros, adnectinas, anticalinas o una variedad de otras moléculas de unión específica a Hb derivadas mediante una variedad de procesos incluyendo DARPinas y DART.

El primer y segundo agentes que se unen a hemoglobina y glucohemoglobina respectivamente pueden ser cualquier resto o composición que se una a hemoglobina y glucohemoglobina respectivamente, y pueden estar marcados detectablemente. En una realización, el primer y segundo agentes son un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo como se discute anteriormente. Pueden ser un anticuerpo monoclonal o anticuerpo policlonal. Se observa que, aunque el agente de captura y el primer agente se unan ambos a Hb, no se unen al mismo epítipo en Hb ni compiten entre sí por la unión a Hb.

En una realización, el segundo agente que se une a glucohemoglobina es un ácido borónico [RB(OH)<sub>2</sub>] o un derivado del mismo. Puede usarse cualquier derivado de ácido borónico, conocido ahora o descubierto más tarde, que se una específicamente a GHb. Preferiblemente, el derivado de ácido borónico tiene alta afinidad por GHb así como una alta tasa de asociación (o "constante de asociación") para unión a GHb y una lenta disociación o "constante de disociación". Las consideraciones prácticas, por ejemplo la capacidad o facilidad de acoplar el ácido borónico con el marcador detectable, pueden favorecer el uso de ácidos borónicos particulares. Dichas consideraciones están dentro del alcance de un especialista en la materia. El segundo agente puede ser, por ejemplo, un boronato de fenilo. Los ejemplos de derivados de ácido borónico incluyen, pero sin limitación, ácido 3-aminofenilborónico, ácido 4-amino-3-nitrofenilborónico o ácido 3- o 4-sulfhidril(o mercapto)fenilborónico, así como aquellos enumerados en la Tabla 1 siguiente. Se muestran en la Figura 4 las estructuras químicas de los derivados de ácido borónico ejemplares que pueden usarse como segundo agente para unirse específicamente a GHb.

Tabla 1: Ácidos borónicos ejemplares y su constante de ionización (pK<sub>a</sub>)

Ácido borónico RB(OH) <sub>2</sub>	pK <sub>a</sub>
Ácido bórico	9,0
Ácido metilborónico	10,4
Ácido fenilborónico	8,9
Ácido 3,5-diclorofenilborónico	7,4
Ácido 3,5-bis(trifluorometil)fenilborónico	7,2
Ácido 3-metoxifenilborónico	8,7
Ácido 4-metoxifenilborónico	9,3
Ácido 4-carboxifenilborónico	8,4
Ácido 2-nitrofenilborónico	9,2
Ácido 4-nitrofenilborónico	7,1
Ácido 4-bromofenilborónico	8,6
Ácido 4-fluorofenilborónico	9,1
Ácido 2-metilfenilborónico	9,7
Ácido 3-metilfenilborónico	9,0
Ácido 4-metilfenilborónico	9,3
Ácido 3,5-dimetilfenilborónico	9,1
Ácido 3-metoxycarbonil-5-nitrofenilborónico	6,9
Ácido 3-piridilborónico	4,0 8,2
Ácido 8-quinolinilborónico	4,0 10
Ácido 2-(R <sup>1</sup> R <sup>2</sup> NCH <sub>2</sub> )fenilborónico	5,2-5,8

El primer y segundo marcadores detectables unidos al primer y segundo agentes, respectivamente, pueden seleccionarse de una amplia variedad de materiales. En realizaciones en que el primer y segundo marcadores detectables se detectan simultáneamente o en la misma región de, p.ej. un soporte sólido, se aprecia que el primer marcador detectable es diferente del segundo marcador detectable o al menos que los marcadores pueden diferenciarse cuando se detectan. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen, pero sin limitación, partículas, 5 marcajes luminiscentes, marcajes calorimétricos, marcajes fluorescentes, marcajes químicos, enzimas, marcajes radioactivos o marcajes de radiofrecuencia, coloides metálicos y marcajes quimioluminiscentes.

Pueden emplearse métodos de detección basados en la absorción y cambio (o falta de cambio) de color, métodos ópticos tales como medir la dispersión de luz, fluorescencia, reflectancia, luminiscencia (p.ej. quimioluminiscencia) o 10 conductividad o capacitancia eléctrica, radiactividad (medida con un contador Geiger, etc.), detección electroquímica de agentes electroactivos liberados, tales como iones de indio, bismuto, galio o telurio, como se describe por Hayes *et al.* (*Analytical Chem.* 66: 1860-1865 (1994)) o ferrocianuro como se sugiere por Roberts y Durst (*Analytical Chem.* 67: 482-491 (1995)). Puede usarse también otros métodos, según sea apropiado. Además, puede usarse un solo método de detección, o pueden usarse conjuntamente múltiples métodos de detección diferentes (p.ej. dos o tres).

En una realización, se miden señales del primer marcador detectable y/o del segundo marcador detectable aplicando luz de una primera fuente de luz y/o una segunda fuente de luz a aquella región de la tira cromatográfica donde se inmoviliza la hemoglobina total. Una o ambas de estas fuentes de luz pueden comprender láseres. Se 15 aprecia que las fuentes de luz pueden ser de longitudes de onda fijas o ajustables y pueden calibrarse para suministrar la frecuencia de luz necesaria para una iluminación óptima del primer marcador detectable y del segundo marcador detectable. En una realización ejemplar, el primer y segundo agentes marcados detectablemente pueden exponerse a luz roja o infrarroja para inducir la fluorescencia del primer y segundo marcadores detectables. 20

En una realización, el primer y segundo marcadores detectables pueden ser un fluoróforo que muestra fluorescencia a una longitud de onda que difiere de aquella a la que el hemo muestra fluorescencia naturalmente. En otra 25 realización, el primer y segundo marcadores detectables pueden ser fluoróforos que muestran fluorescencia a diferentes longitudes de onda, y que son ambas diferentes de aquella a la que el hemo muestra fluorescencia naturalmente. En aún otra realización, se miden simultáneamente las señales del primer marcador detectable y del segundo marcador detectable. Por ejemplo, el primer y segundo marcadores detectables que se detectan simultáneamente pueden ser fluoróforos que muestran fluorescencia a diferentes longitudes de onda y que son 30 ambas diferentes de aquella a la que el hemo muestra fluorescencia naturalmente. En una realización ejemplar, el primer y segundo marcadores detectables pueden exponerse simultáneamente a luz roja o infrarroja para inducir la fluorescencia del primer y segundo marcadores detectables.

Los ejemplos de fluoróforos que pueden usarse incluyen, pero sin limitación Dy-636 de Dyomics o HiLytePlus 647 de Anaspec, mostrando ambos fluorescencia a aproximadamente 635 nm, o Dy-782 de Dyomics o DyLight 800 de 35 Pierce, mostrando ambos fluorescencia a aproximadamente 800 nm. Se describen además métodos para la detección de dos (o más) marcadores detectables, p.ej. fluoróforos, así como sistemas/dispositivos que pueden usarse para la detección, en la solicitud de patente de EE.UU. n.º de serie 12/760.518, presentada del 14 de abril de 2010 y titulada "Diagnostic Devices and Related Methods".

Las Figuras 5a, 5b y 6 muestran reacciones ejemplares para la conjugación de un fluoróforo con un derivado de 40 ácido borónico que se une a GHb. Como se muestra en la Figura 5a, puede conjugarse un ácido borónico que contiene un residuo amina en posición 3' (ácido 3-aminofenilborónico) o en posición 4' (ácido 4-amino-3-nitrofenilborónico) con un fluoróforo (p.ej., DY-782), formando derivado de fluoróforo-ácido borónico conjugado con un enlace amida. La Figura 5b muestra la conjugación de un ácido borónico que contiene un residuo de sulfhidrilo en posición 3' o 4' (p.ej., ácido 3-mercaptofenilborónico o ácido 4-mercaptofenilborónico) con un fluoróforo (p.ej. DY- 45 636). La Figura 6 muestra la conversión directa o reemplazo del ácido carboxílico de un fluoróforo por un grupo ácido borónico sin el uso de un grupo amina o sulfhidrilo.

En una realización ejemplar, se libera hemoglobina de las células de una muestra y se pone en contacto con un primer agente marcado con un primer marcador detectable que se une a hemoglobina, y con un segundo agente que 50 está marcado con un segundo marcador detectable que se une solo a glucohemoglobina. El primer marcador detectable es un primer fluoróforo que muestra fluorescencia tras exposición a luz de una primera longitud de onda y el segundo marcador detectable es un segundo fluoróforo que muestra fluorescencia tras exposición a luz de una segunda longitud de onda. La hemoglobina marcada detectablemente, incluyendo glucohemoglobina marcada detectablemente, se inmoviliza entonces en la misma región en un soporte sólido. Se miden las señales del primer marcador detectable y del segundo marcador detectable inmovilizado sobre el soporte sólido exponiendo la región de la tira cromatográfica en que se inmoviliza la hemoglobina, incluyendo glucohemoglobina, a luz de la primera y 55 segunda longitudes de onda. Se determina el porcentaje de glucohemoglobina en la muestra basándose en las señales del primer marcador detectable y del segundo marcador detectable. Opcionalmente, se miden simultáneamente las señales del primer marcador detectable y del segundo marcador detectable exponiendo simultáneamente la región del soporte sólido en que se inmoviliza la hemoglobina, incluyendo glucohemoglobina, a luz de la primera y segunda longitudes de onda.

En otro aspecto de la invención, la invención proporciona una glucohemoglobina acoplada tanto con un anticuerpo que reconoce hemoglobina marcada con un marcador detectable como con un ácido borónico o derivado del mismo marcado con un segundo marcador detectable. En una realización, el ácido borónico o derivado del mismo se acopla directamente con el marcador detectable y puede detectarse mediante cualquier medio descrito anteriormente sin el uso de otro agente, p.ej. un anticuerpo específico del ácido borónico/derivado de ácido borónico o de la GHb unida. El primer y segundo marcadores detectables pueden seleccionarse de cualquiera de las categorías y ejemplos de marcadores discutidos anteriormente. De forma similar, el ácido borónico o derivado del mismo puede ser cualquier compuesto adecuado, por ejemplo cualquiera de los descritos anteriormente.

En una realización preferida, la invención comprende un sistema para determinar cuantitativamente el porcentaje de glucohemoglobina en una muestra de sangre. El sistema puede ser cualquier dispositivo que permita localizar la hemoglobina y glucohemoglobina de tal modo que puedan determinarse las cantidades relativas de las dos. En una realización, el sistema puede ser una tira reactiva, p.ej., una tira reactiva de flujo lateral que soporta un flujo unidireccional o bidireccional de fluido a través de la tira reactiva. Como alternativa, el sistema es una varilla medidora que se sumerge en la muestra que comprende hemoglobina liberada de RBC. En la realización de varilla medidora, se apreciará que la muestra lisada se premezcla con el primer y segundo agentes marcados detectablemente. En otra realización, el soporte sólido es una placa de plástico de múltiples pocillos usada en ensayos ELISA o un sistema microcapilar.

En aún otra realización, el sistema puede ser un dispositivo microfluídico. Como ejemplo, los dispositivos microfluídicos pueden emplear cámaras en que se inmoviliza el agente de captura que se une a Hb total. Se describen métodos y dispositivos microfluídicos, por ejemplo, en Martínez *et al.*, "Three-Dimensional Microfluidic Devices Fabricated in Layered Paper and Tape", *PNAS*, vol.105, nº 50 (16 de diciembre de 2008) 19606-19611; P. K. Sorger, "Microfluidics Closes in on Point-of-Care Assays." *Nature Biotechnology*, vol. 26, nº 12 (diciembre. 2008) 1345-1378 y B. Grant, "The 3 Cent Microfluidics Chip", *The Scientist* (8 de diciembre de 2008).

La solicitud proporciona una tira reactiva que comprende una tira cromatográfica, un recubrimiento sobre una porción de la tira cromatográfica que comprende un agente de captura inmovilizado que se une a la hemoglobina en una muestra, una región en la tira cromatográfica en la que se añade la muestra y una región en la tira cromatográfica que comprende un primer agente marcado con un primer marcador detectable que se une a hemoglobina, y un segundo agente marcado con un segundo marcador detectable que se une solo a glucohemoglobina. La tira reactiva se configura de tal modo que la muestra que se añade a la tira reactiva fluya a través de la región que comprende el primer y segundo agentes marcados detectablemente antes de alcanzar la región que comprende el agente de captura. Por ejemplo, la región sobre la tira cromatográfica que comprende el primer agente marcado detectablemente y el segundo agente marcado detectablemente puede localizarse en la región en la que se añade la muestra o entre la región en que se añade la muestra y la región que comprende el agente de captura. El primer y segundo agentes, el agente de captura, así como el primer y segundo marcadores detectables pueden ser cualquier agente o marcador como se describe anteriormente.

En una realización, el agente de captura se inmoviliza en una zona de captura. La zona de captura puede estar conformada con cualquier tamaño o forma. Podría ser una banda (p.ej. una "banda de ensayo"), concretamente con forma de rectángulo que cubre parcial o completamente la anchura de la tira reactiva en una dirección perpendicular al flujo del fluido, o podría ser un "punto" que es aproximadamente circular u oval. La tira cromatográfica puede comprender más de una zona de captura que captura hemoglobina, incluyendo glucohemoglobina, de tal modo que se coloquen la glucohemoglobina y hemoglobina no glicada.

En otra realización, la tira cromatográfica comprende al menos dos zonas de captura, una primera zona de captura que comprende un primer agente de captura que inmoviliza la glucohemoglobina y una segunda zona de captura que comprende un segundo agente de captura que inmoviliza la hemoglobina no glucosilada. En esta realización, la señal del primer marcador detectable unido a hemoglobina se mediría tanto de la primera como segunda zonas de captura, mientras que la señal del segundo marcador detectable unido solo a glucohemoglobina se mediría solo de la primera zona de captura.

Debe apreciarse que, a la vista de las enseñanzas de la presente memoria, pueden contemplarse realizaciones alternativas de los métodos y tiras reactivas. Por ejemplo, está también dentro del alcance de la invención un método en que se pone en contacto la hemoglobina liberada de RBC con un agente marcado detectablemente que se une específicamente a hemoglobina (p.ej. un anticuerpo) y se inmoviliza entonces sobre una tira reactiva que comprende dos zonas de captura, una primera zona de captura con un agente de captura específico de glucohemoglobina (tal como un anticuerpo anti-GHb o un ácido borónico o derivado del mismo) y una segunda zona de captura que se une a Hb, de tal modo que la muestra se pone en contacto con la primera zona de captura antes de ponerse en contacto con la segunda zona de captura. En esta realización, puede determinarse el porcentaje de glucohemoglobina en la muestra basándose en las señales medidas de las diferentes posiciones de la tira reactiva. De forma similar, están también dentro del alcance de la invención realizaciones alternativas de la tira reactiva que comprenden dos zonas de captura, una primera zona de captura que comprende un primer agente de captura que se une a e inmoviliza GHb, que está localizada más cerca de la región de la tira reactiva en que se añade la muestra en comparación con una segunda zona de captura que comprende un segundo agente de captura que se une a e inmoviliza Hb.

5 En algunas realizaciones, la tira reactiva comprende una almohadilla de conjugado que comprende el primer y segundo agentes marcados detectablemente. Como alternativa, o además, la tira reactiva puede comprender una almohadilla de muestra a la que se añade la muestra. En realizaciones de la tira reactiva que comprenden tanto una almohadilla de conjugado como una almohadilla de muestra, la almohadilla de muestra puede localizarse generalmente encima de la almohadilla de conjugado, de tal modo que la muestra que se añade a la almohadilla de muestra fluya a la almohadilla de conjugado y desde la almohadilla de conjugado a la tira cromatográfica. Como alternativa, la almohadilla de conjugado puede localizarse sobre la tira cromatográfica entre la almohadilla de muestra y la región o regiones que comprenden el agente de captura inmovilizado (la zona o zonas de captura).

10 En una realización, la almohadilla de muestra actúa como reservorio y permite que el fluido, p.ej. la muestra o tampón, se libere lenta y constantemente sobre la almohadilla de conjugado y la tira cromatográfica. Esto no solo asegura un flujo uniforme de la muestra a través de la tira reactiva, sino que proporciona también suficiente tiempo para que se unan la hemoglobina y glucohemoglobina presentes en la muestra al primer y segundo agentes marcados detectablemente, respectivamente, que están presentes en la almohadilla de conjugado. Como se apreciará, el tiempo de retención de la almohadilla de muestra varía según el tamaño de la almohadilla de muestra, el tamaño de la tira reactiva y el volumen de muestra añadida a la almohadilla de muestra. En algunas realizaciones, la almohadilla de muestra puede liberar la muestra durante un periodo de aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 50 minutos, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 35 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 25 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 3 minutos, aproximadamente 2 minutos o aproximadamente 1 minuto. En una realización ejemplar, la almohadilla de muestra puede retener y liberar tampón y muestra durante más de 20 minutos.

Se discuten además las configuraciones ejemplares de tiras reactivas y sistemas que pueden usarse para efectuar los métodos/ensayos de la invención en la solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 12/760.320, la solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 12/760.518, las patentes de EE.UU. nº 6.528.323, 7.229.839 y 7.309.611.

25 Debe apreciarse que, a la vista de las enseñanzas de la presente memoria, pueden contemplarse realizaciones alternativas de los métodos y tiras reactivas. Por ejemplo, está también dentro del alcance de la invención un método en que se pone en contacto la hemoglobina liberada de RBC con un agente marcado detectablemente que se une específicamente a hemoglobina (p.ej., un anticuerpo anti-Hb) y se inmoviliza entonces sobre una tira reactiva que comprende dos zonas de captura, una primera zona de captura con un agente de captura específico de glucohemoglobina (tal como un anticuerpo anti-GHb o un ácido borónico o derivado del mismo) y una segunda zona de captura que se une a Hb, de tal modo que se pone en contacto la muestra con la primera zona de captura antes de poner en contacto con la segunda zona de captura. En esta realización, puede determinarse el porcentaje de glucohemoglobina en la muestra basándose en las señales medidas en las diferentes posiciones de la tira reactiva. De forma similar, están también dentro del alcance de la invención realizaciones alternativas de la tira reactiva que comprenden dos zonas de captura, una primera zona de captura que comprende un primer agente de captura que se une a e inmoviliza GHb, que está localizada más cerca de la región de la tira reactiva en que se añade la muestra, en comparación con una segunda zona de captura que comprende un segundo agente de captura que se une a e inmoviliza Hb.

**REIVINDICACIONES**

1. Una glucohemoglobina acoplada tanto con (i) un anticuerpo que reconoce hemoglobina marcada con un primer marcador detectable como con (ii) ácido borónico o un derivado del mismo marcado con un segundo marcador detectable.
- 5 2. Un método para la determinación del porcentaje de glucohemoglobina en una muestra que comprende
  - (a) detectar:
    - (i) un primer marcador detectable acoplado con un primer agente que se une a la hemoglobina en dicha muestra; y
    - 10 (ii) un segundo marcador detectable acoplado con un segundo agente que se une solo a la glucohemoglobina en dicha muestra; y
  - (b) determinar el porcentaje de glucohemoglobina en dicha muestra basándose en la cantidad del primer marcador detectable y el segundo marcador detectable detectada en dicha muestra.
3. El método de la reivindicación 2, en el que:
 

15 se pone en contacto la hemoglobina liberada de células de la muestra con el primer agente que está marcado con el primer marcador detectable y con el segundo agente que está marcado con el segundo marcador detectable;

estando inmovilizada la hemoglobina marcada detectablemente sobre un soporte sólido;

y en el que

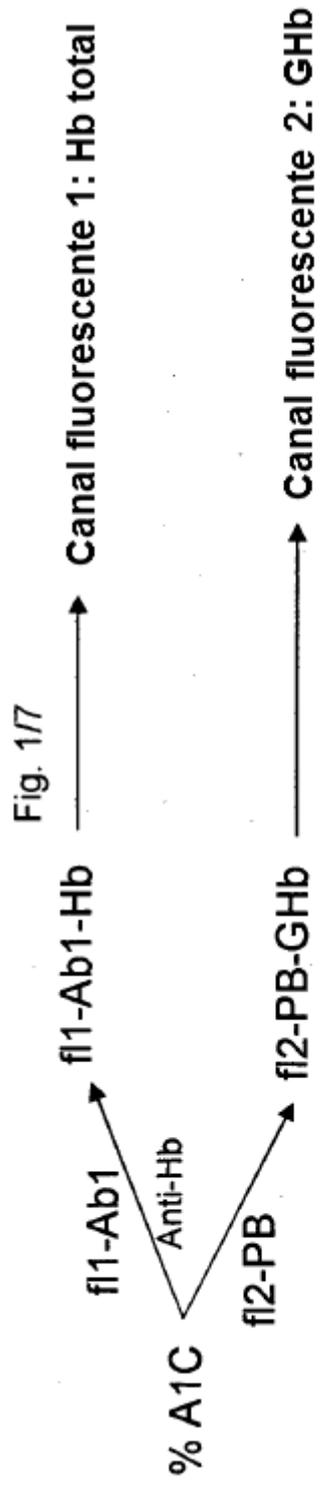
se obtienen la cantidad del primer marcador detectable y el segundo marcador detectable midiendo las señales del primer marcador detectable y del segundo marcador detectable inmovilizado sobre el soporte sólido.
- 20 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, en el que se detectan simultáneamente el primer marcador detectable y el segundo marcador detectable.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en el que el primer marcador detectable es un primer fluoróforo que muestra fluorescencia tras exposición a luz de una primera longitud de onda y el segundo marcador detectable es un segundo fluoróforo que muestra fluorescencia tras exposición a luz de una segunda longitud de onda, en el que la primera longitud de onda es diferente de la segunda longitud de onda.
- 25 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en el que el segundo agente es un ácido borónico o derivado del mismo.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-6, en el que (i) se pone en contacto la hemoglobina con el primer agente marcado con el primer marcador detectable y con el segundo agente marcado con el segundo marcador detectable antes de inmovilizar la hemoglobina sobre el soporte sólido; o (ii) se añade la hemoglobina al soporte sólido, comprendiendo el soporte sólido una región que comprende el primer agente marcado con el primer marcador detectable y el segundo agente marcado con el segundo marcador detectable, y en el que se pone en contacto la hemoglobina con el primer agente marcado y con el segundo agente marcado presentes sobre el soporte sólido antes de inmovilizar.
- 30 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en el que se detectan el primer agente y el segundo agente en aproximadamente la misma región del soporte sólido.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-8, en el que se miden las señales del primer marcador detectable y el segundo marcador detectable aplicando luz de una primera fuente de luz y una segunda fuente de luz a la hemoglobina inmovilizada sobre el soporte sólido, en el que la primera fuente de luz o la segunda fuente de luz comprenden opcionalmente un láser, y en el que la primera fuente de luz comprende opcionalmente un primer láser y la segunda fuente de luz comprende opcionalmente un segundo láser que es diferente del primer láser.
- 40 10. El método de la reivindicación 3, en el que:
 

el primer marcador detectable es un primer fluoróforo que muestra fluorescencia tras exposición a luz de una primera longitud de onda y el segundo marcador detectable es un segundo fluoróforo que muestra fluorescencia tras exposición a luz de una segunda longitud de onda;

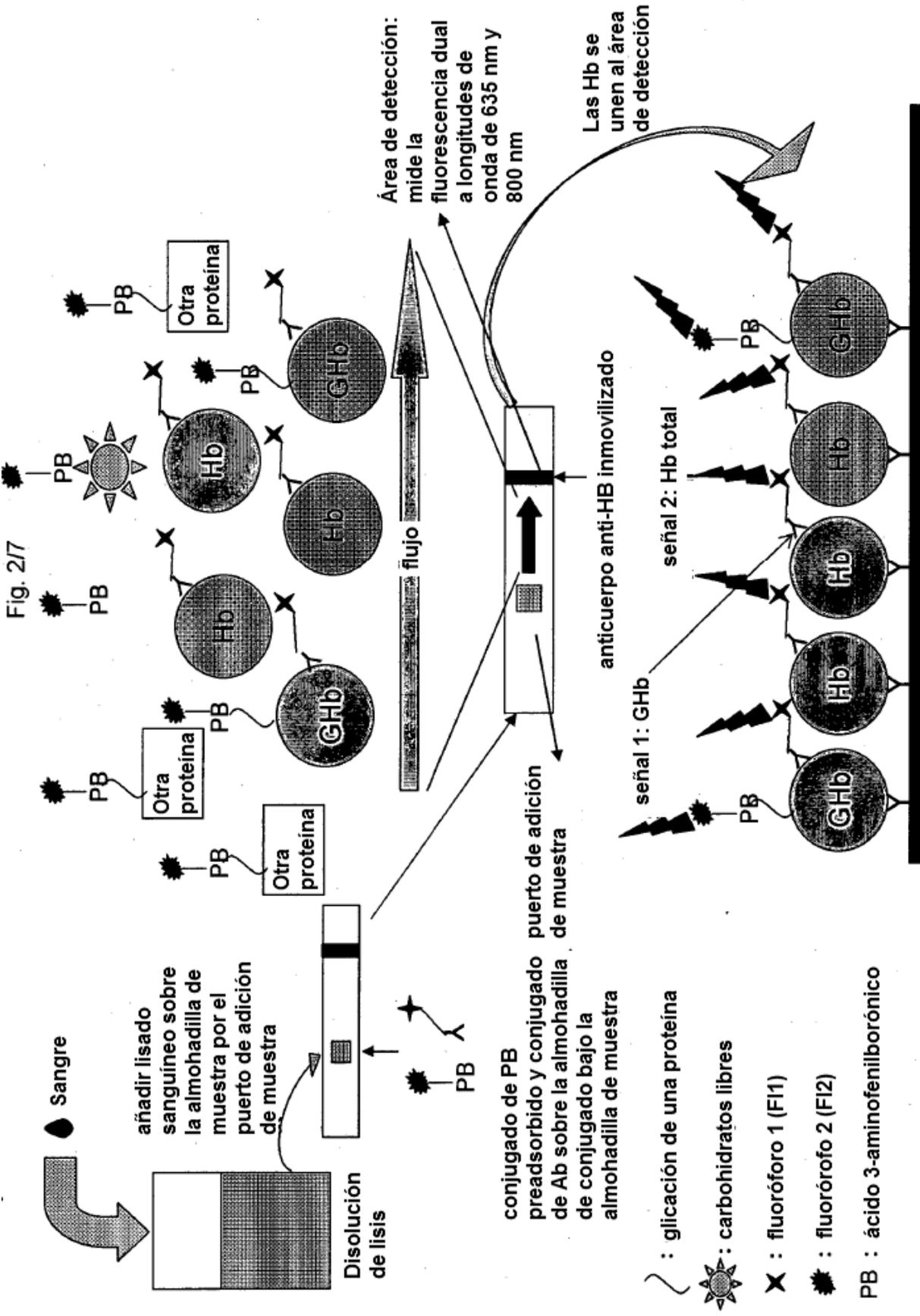
en el que la hemoglobina marcada detectablemente, incluyendo la glucohemoglobina marcada detectablemente, se inmoviliza en la misma región sobre un soporte sólido;

y en el que se miden simultáneamente las señales del primer marcador detectable y del segundo marcador detectable inmovilizado sobre el soporte sólido exponiendo la región del soporte sólido en que se inmoviliza la hemoglobina, incluyendo glucohemoglobina, a luz de la primera y segunda longitudes de onda.

- 5 11. El método de la reivindicación 10, en el que el primer y segundo agentes se exponen a luz roja e infrarroja, respectivamente, o a luz infrarroja y roja respectivamente, para inducir la fluorescencia del primer y segundo marcadores detectables.
12. Una tira reactiva que comprende:
- una tira cromatográfica;
- 10 un recubrimiento sobre una porción de la tira cromatográfica, comprendiendo el recubrimiento un agente de captura que se une a la hemoglobina en una muestra;
- una región en la tira cromatográfica en que se añade la muestra y
- una región sobre la tira cromatográfica que comprende un primer agente que se une a hemoglobina y un segundo agente que se une solo a glucohemoglobina, en la que el primer agente está marcado con un primer marcador detectable y el segundo agente está marcado con un segundo marcador detectable;
- 15 en la que la región en la tira cromatográfica que comprende el primer agente y el segundo agente está localizada (i) en la región en que se añade la muestra o (ii) entre la región en que se añade la muestra y la región que comprende el agente de captura, de tal modo que la muestra que se añade a la tira reactiva fluya a través de la región que comprende el primer y segundo agentes antes de alcanzar la región que comprende el agente de captura.
- 20 13. La tira reactiva de la reivindicación 12, en la que el primer marcador detectable es un fluoróforo que muestra fluorescencia tras exposición a luz de una primera longitud de onda y el segundo marcador detectable es un fluoróforo que muestra fluorescencia tras exposición a luz de una segunda longitud de onda que es diferente de la primera longitud de onda; y en la que la luz de la primera y segunda longitudes de onda es luz roja e infrarroja respectivamente, o infrarroja y roja respectivamente.
- 25 14. La tira reactiva de la reivindicación 12 o 13, en la que el segundo agente es un ácido borónico o derivado del mismo.



PB= ácido 3-aminofenilborónico



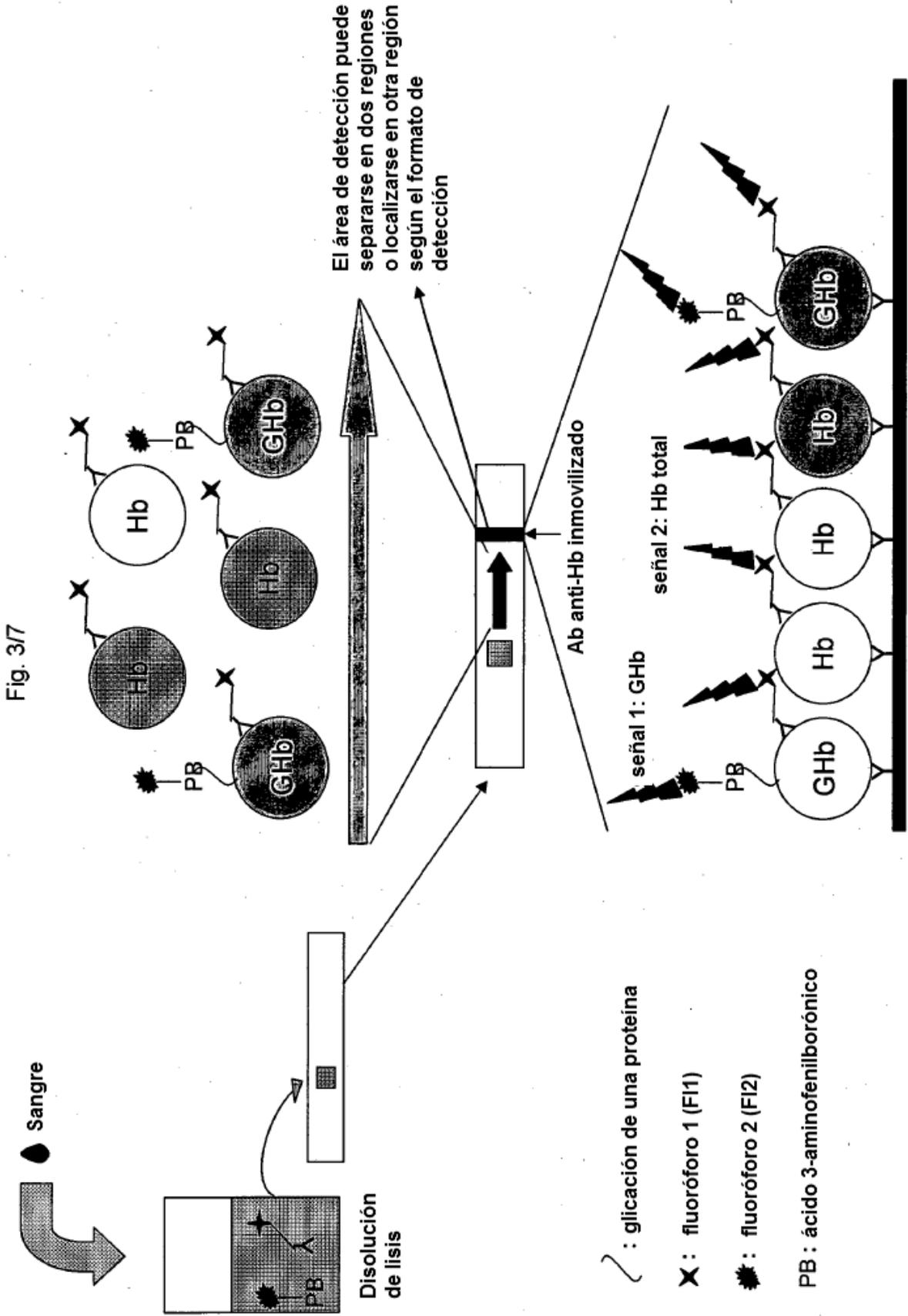
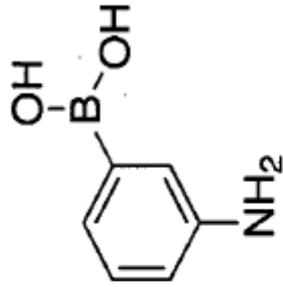


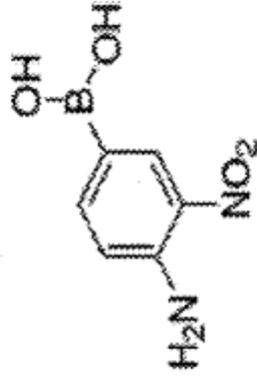
Fig. 4/7

**Ejemplos de derivados de ácido borónico**

Ácido fenilborónico que contiene un grupo amino

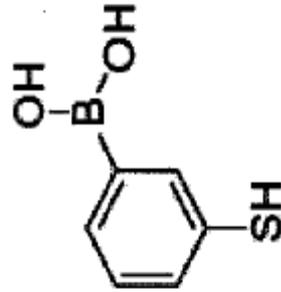


ácido 3-amino**fenilborónico**

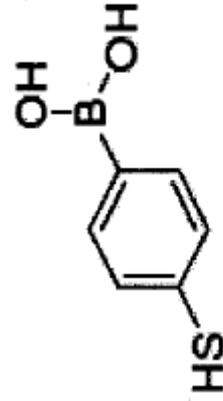


ácido 4-amino-3-nitro**fenilborónico**

Ácido fenilborónico que contiene un grupo sulfhidrilo



ácido 3-mercapto**fenilborónico**



ácido 4-mercapto**fenilborónico**

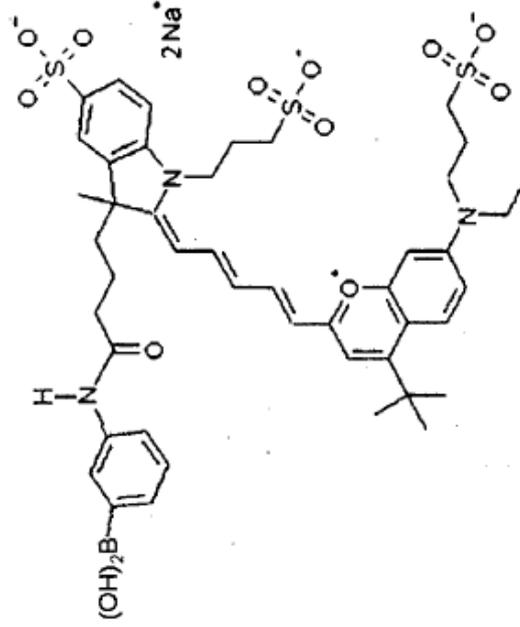
Fig. 5a/7

Reacciones de conjugación de derivados de ácido borónico



R es fluoróforo, R'-NH<sub>2</sub> es derivado de ácido borónico que tiene un grupo amina como ácido 3-aminofenilborónico o ácido 4-amino-3-nitrofenilborónico.

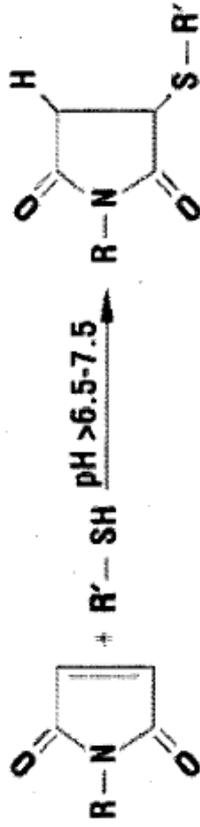
Ejemplo de conjugado de ácido borónico:



Fluoróforo, ácido 3-aminofenilborónico marcado con éster de NHS DY-782 (Dyomics) mediante reacción de conjugación

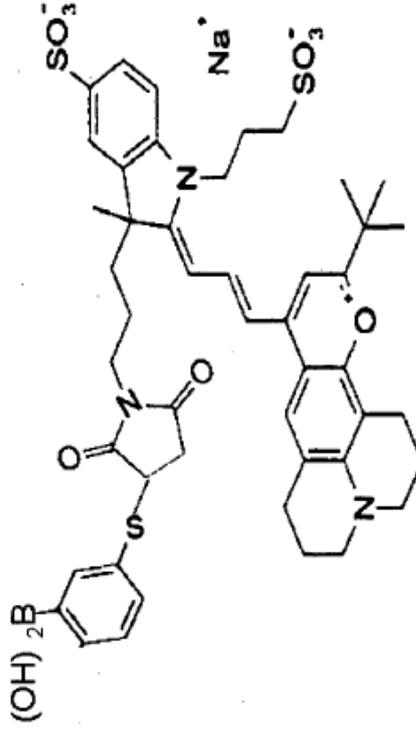
Fig. 5b/7

Reacciones de conjugación de derivados de ácido borónico



R es fluoróforo, R'-SH es derivado de ácido borónico que tiene un grupo sulfhidrilo como ácido 3-mercaptofenilborónico o ácido 4-mercaptofenilborónico

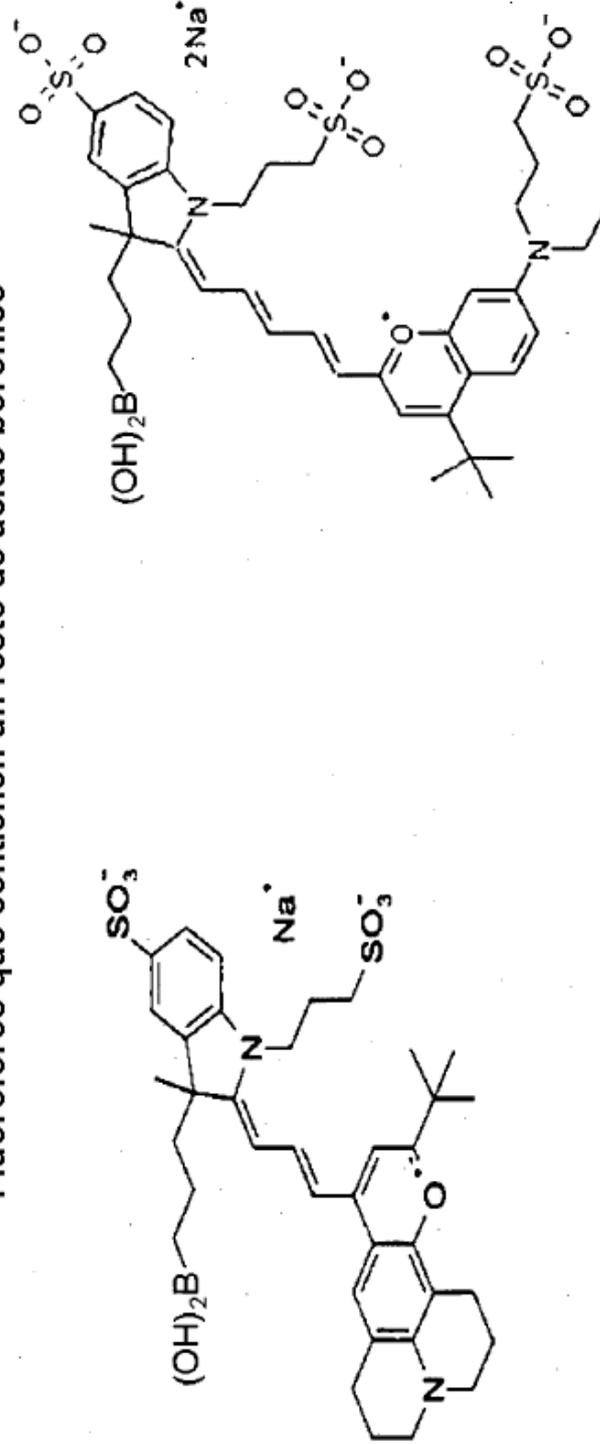
Ejemplo de conjugado de ácido borónico:



Fluoróforo, ácido 3-mercaptofenilborónico marcado con maleimida DY-636 (Dyomics)

Fig. 6/7

Fluoróforos que contienen un resto de ácido borónico



Dy-636 que contiene un resto de ácido borónico Dy-782 que contiene un resto de ácido borónico

